

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung  
des Robert Koch-Institutes Berlin

Direktor: Prof.Dr.med. Hansjürgen Raettig

---

VERGLEICHENDE TIEREXPERIMENTE MIT IMPFSTOFFEN  
AUS CHEMISCH INAKTIVIERTEN S.TYPHI MURIUM BAK-  
TERIEN BEI ORALER UND SUBKUTANER IMMUNISIERUNG

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingrid Kordes geborene Janisch  
aus Berlin

1969



Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung  
des Robert Koch-Institutes Berlin  
Direktor: Prof.Dr.med. Hansjürgen Raettig

---

VERGLEICHENDE TIEREXPERIMENTE MIT IMPFSTOFFEN  
AUS CHEMISCH INAKTIVIERTEN S.TYPHI MURIUM BAK-  
TERIEN BEI ORALER UND SUBKUTANER IMMUNISIERUNG

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingrid Kordes geborene Janisch

aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med.Hans Heinz Naumann  
Referent: Professor Dr.med.Hansjürgen Raettig  
Korreferent: Professor Dr.med.Bernhard Schmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21.April 1969

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                         | Seite |
|---------------------------------------------------------|-------|
| A. EINLEITUNG                                           | 3     |
| B. MATERIAL UND METHODEN                                | 5     |
| C. ERGEBNISSE                                           | 8     |
| 1. DMSO-Inaktivierung                                   | 8     |
| 2. Lipopolysaccharide                                   | 12    |
| 3. Acetonbehandlung                                     | 16    |
| 4. Hitzeinaktivierung                                   | 16    |
| a. 60°C/75 min                                          |       |
| b. 100°C/10 min                                         |       |
| D. DISKUSSION                                           | 29    |
| 1. Wirkungsweise der verschiedenen Inaktivierungsmittel | 31    |
| 2. Gegenüberstellung der Wirkung der Impfstoffe         | 33    |
| 3. Gegenüberstellung der Wirkung der Applikationsformen | 34    |
| E. ZUSAMMENFASSUNG                                      | 35    |
| F. LITERATUR                                            | 36    |
| Lebenslauf                                              |       |



## A. EINLEITUNG

=====

Seit mehr als 60 Jahren wird subkutan gegen Typhus immunisiert. Bisher konnte aber weder eine optimale Impfstoffaufbereitung gefunden werden, noch ist die Anwendungsform zufriedenstellend, denn neben einem ausreichenden Schutz sollte eine schnelle und einfache Ausführung gewährleistet sein. Aus diesem Grunde haben sich mehrere Autoren mit der Frage der oralen Immunisierung befaßt ( 2,7,12, 17-21, 23, 27 ). RAETTIG konnte in Tier- und Feldversuchen die gute Wirkung der oralen Immunisierung mit inaktivierten Bakterien nachweisen und die Vorteile gegen - über der subkutanen Immunisierung zeigen.

Von der Typhuskommission in Jugoslawien ( 31 ) wurde aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Feld- und Tierversuche, bei denen subkutan immunisiert wurde, gefordert, daß weitere Versuche unternommen werden müßten, um eine noch wirksamere Präparation der Typhusbakterien zur Impfstoffherstellung zu finden. In den Versuchen wurden alkoholabgetötete sowie hitzeinaktivierte (  $56^{\circ}\text{C}/60\text{ min}$  ) mit Phenol versetzte Bakterien als Impfstoffe verwendet. Dabei kam man zu dem Ergebnis, daß der Hitze-Phenol-Impfstoff einen Schutz von 70 % ergab. In einem weiteren in Jugoslawien durchgeführten Feldversuch stellte man dem Hitze-Phenol-Impfstoff, der im Gegensatz zu dem ersten Fall gefriergestrocknet wurde, einen Impfstoff aus acetonebehandelten Bakterien gegenüber ( 32 ). Diesmal zeigte der Hitze-Phenol-Impfstoff nur 50 % Schutzwirkung, der Acetonimpfstoff aber einen Schutz von 80 %. Ebenso wie bei den Injektionsimpfstoffen ist bei den oral anzuwendenden die Frage nach der optimalen Zusammensetzung noch nicht beantwortet. Ich habe deshalb einige Impfstoffe ver-

schiedener Herstellungsart an weißen Mäusen vergleichend geprüft.

Folgende Impfstoffe wurden verwendet:

1. Ein durch DMSO-Einwirkung auf Bakterien hergestellter Totimpfstoff. Hierbei kann die Frage gestellt werden, ob das im Impfstoff verbleibende DMSO die an der Haut nachgewiesene Steigerung der Permeabilität auch im Magen-Darmtrakt hervorruft.
2. Das aus Typhusbakterien hergestellte Lipopoly - saccharid, welches nach Westphal dem Endotoxin entspricht und Träger der serologischen O-Spezifität ist.
3. Der nach LANDY mit Aceton aufgearbeitete Impfstoff, bei dem durch die Aceton-Behandlung das O-Antigen angegriffen werden kann, während das Vi-Antigen - soweit vorhanden - weitgehend erhalten bleibt.

Mit diesen auf chemischem Wege inaktivierten Impfstoffen sollten thermisch inaktivierte (  $60^{\circ}\text{C}/75 \text{ min}$  und  $100^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$  ) Bakterien in ihrer antigenen Wirkung verglichen werden, wobei geprüft werden sollte, inwieweit, aufgrund der unterschiedlichen Dosiswirkung der angewendeten Temperaturen, ein unterschiedlicher Schutzeffekt erreicht werden kann.

## B. MATERIAL UND METHODEN

=====

### 1. Herstellung der Bakteriensuspension:

*Salmonella typhi* murium ( Stämme: 6639, 6643, 6616, 6656, 6659 ) wurden im Kühlschrank auf Agarplatten gehalten. Zur Anzüchtung wurde Vollbouillon mit je einer Oese dieser Stämme beimpft und 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank belassen. Von dieser infizierten Bouillon (  $10^8$  Keime/ml ) wurden 7 ml auf große Agarplatten gegeben und 20 Stunden bei 37°C bebrütet, geerntet wurde mit Glasspateln und physiologischer Kochsalzlösung. Die Bakteriensuspension wurde zweimal 1 Stunde in der Zentrifuge bei 3 000 U/min mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Einstellung auf  $10^8$  Keime/ml wurde durch austitrieren und durch auszählen auf Agarplatten vorgenommen. Die Suspension wurde im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag verarbeitet.

### 2. Inaktivierung:

#### a. DMSO ( Dimethylsulfoxyd )

Die Bakteriensuspension wurde zu gleichen Teilen mit 99 %igem DMSO schnell versetzt, dabei entstand kurzzeitig eine Temperatur von 40°C. Diese Lösung wurde 24 Stunden mit einem Magnetrührer bewegt. Die Sterilitätskontrolle war negativ. Daraufhin erfolgte die Lyophilisierung bei einer Temperatur von -56°C im Eiskern des Trockengutes bei einem Vakuum von  $5 \times 10^{-2}$  Torr bis  $2 \times 10^{-2}$  Torr.

Das Endvakuum war kleiner als  $10^{-3}$  Torr. Die Kondensatortemperatur betrug -76°C. Unter diesen Bedingungen wurde eine Restfeuchtigkeit von weniger als 1 % erreicht.

#### b. LPS ( Lipopolysaccharid )

Die oben beschriebenen Stämme werden in Vollbouillon überimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die infizierte Bouillon wird auf Sautonplatten gegeben, 24 Stunden bei 37°C bebrütet, geerntet mit Glasspateln und physiologischer Kochsalzlösung, durch Glaswollefilter geschickt und im Exsikkator getrocknet. Ungefähr 10 g Trockensubstanz werden mit 350 ml Aqua dest. und 350 ml wassergesättigter Phenollösung versetzt, eine halbe Stunde auf 68°C erhitzt, auf 5 - 10°C abgekühlt und 20 min bei 3 500 U/min zentrifugiert. Die Phenollösung wird abpipettiert und

der Niederschlag mit 300 ml Aqua dest. aufgefüllt, auf 68°C erhitzt, abgekühlt und zentrifugiert bei 3 500 U/min. Die erhaltene RNS und LPS wird 3 Tage dialysiert, wobei das Phenol vollständig entfernt wird. Daraufhin wird bei 30°C auf 100 ml eingedampft und in 600 ml Äthanol ( 96 %ig ) und 4 g Natriumacetat gefällt und getrocknet. Von der Trockensubstanz wird eine 3 %ige Lösung hergestellt und 4 Stunden bei 40 000 U/ml in der präparativen Ultrazentrifuge Spinco ( BECKMANN ) zentrifugiert. Dieser Vorgang wird mit dem Niederschlag wiederholt, um die noch vorhandene RNS aus der LPS zu entfernen. Von dem Niederschlag wird eine 1 %ige Lösung hergestellt, die wiederum in der Spinco bei 50 000 U/min zentrifugiert wird. Die Prüfung auf Reinheit erfolgt mit dem Spektralphotometer. Der RNS-Gehalt lag nie über 4 %. Gelagert wurde der Impfstoff im Kühlschrank bei +4°C.

c. Acetonbehandlung nach LANDY ( 10 )

Die wie oben beschrieben hergestellte Bakterien-suspension wurde in einem Verhältnis von 1 : 2 mit Aceton ( Merck 8590802 ) vermischt. Dann 24 Stunden mit einem Magnetrührer gerührt. Das Aceton wird abpipettiert und der Rückstand 3 x mit physiologischer Kochsalzlösung in der Zentrifuge bei 3 000 U/min gewaschen. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei +4°C.

d. Thermische Inaktivierung

100 ml der bisher verwendeten Bakteriensuspension wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben im Wasserbad bei 60°C/75 min und 100°C/ 10 min ( Höppler Thermostat ) inaktiviert und danach unter der Wasserleitung abgekühlt. Der Impfstoff wurde bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

3. Sterilitätskontrolle:

Zur Sterilitätskontrolle wurden 0,5 ml der hergestellten Suspension in 4,5 ml Vollbouillon verimpft und 0,3 ml der Suspension auf kleine Agarschalen gegeben. Bouillon und Agarplatten zeigten nach 24 Stunden Bebrüten kein Bakterienwachstum.

4. Versuchstiere:

Die Versuche wurden mit weißen NMRI ( Naval Medical Research Institute ) Mäusen aus der Zucht des RKI durchgeführt. Das Anfangsgewicht der Tiere lag bei 14 g. Je 25 Tiere wurden in Plastikkäfigen gehalten und mit Altromin und Leitungswasser ernährt.

5. Immunisierung:

Die Mäuse wurden 10 Tage lang mit 0,25 ml des jeweiligen Impfstoffes mit einer stumpfen gebogenen Metallsonde oral immunisiert. Der LPS Impfstoff enthielt 0,1 mg LPS pro Dosis. Die subkutane Immunisierung erfolgte drei mal innerhalb von 10 Tagen mit 0,1 ml; der LPS Impfstoff enthielt 0,03 mg pro Dosis. Sichtbare Verletzungen konnten bei den Tieren nicht festgestellt werden, die Kontrolltiere blieben unbehandelt.

6. Infektion:

Das Infektionsmaterial wurde aus den Stämmen 6616, 6639, 6643, 6656, 6659 ( *S.typhi murium* ) hergestellt. Je eine Oese wurde in Vollbouillon gegeben und 6 Stunden bei 37°C bebrütet. Von dieser Bouillon erhielten die Tiere 10 Tage nach der letzten Immunisierung 0,2 ml oral. Die Keimzahl betrug  $10^8$  Keime / ml. Da nach dem 25.Tag nach der Infektion nur noch wenige Tiere starben, wurde zu diesem Zeitpunkt die Beobachtung abgebrochen.

## C. ERGEBNISSE

=====

In den Versuchen sind Mäuse oral und subkutan immunisiert und nachfolgend oral infiziert worden. Diese Versuchsanordnung wurde gewählt, weil sie der natürlichen Infektion am nächsten kommt und damit ein brauchbares Modell für den Krankheitsverlauf mit Immunisierungsschutz darstellt. Weiterhin sollte die orale Immunisierung der subkutanen gegenüber gestellt werden, um zu prüfen, ob sich im Tierversuch ein Unterschied in der Schutzwirkung zeigt. Die Resultate der einzelnen Versuche können untereinander nur bedingt verglichen werden, da aus technischen Gründen nicht alle Impfstoffe gleichzeitig geprüft werden konnten und daher die Mortalität der Kontrolltiere wegen der unterschiedlichen Virulenz des Infektionsmaterials Schwankungen unterworfen war. Deshalb wurden für die einzelnen Versuche jeweils entsprechende Kontrollen angesetzt, um im Verhältnis zu diesen die Schutzwirkung zu bestimmen. Als Maß für den Schutz der immunisierten Tiere wurde die Mortalitätssenkung gegenüber den Kontrolltieren benutzt.

In Tabelle I und II sind die Versuchsergebnisse mit dem DMSO Impfstoff angegeben. Die Mortalität der oral immunisierten Tiere beträgt 41,4 %, die der Kontrollen 45,4 %. Die Differenz Db beträgt also 4,0 %, die zulässige Zufallsdifferenz Dz aber 12,5 %, der Echtheitswert ist mit 0,32 kleiner als 1. Der Wirkungsindex beträgt 8,9. Das Ergebnis liegt also innerhalb der statistischen Streuung. Aus diesem Grunde kann eine Schutzwirkung des DMSO Impfstoffes bei oraler Immunisierung nicht angenommen werden. Die beobachtete Differenz Db bei den subkutan immunisierten Tieren liegt bei 15,0 %. Die größte zulässige Zufallsdifferenz Dz beträgt 22,0 %. Der Echtheitswert

| Versuch | Immunisierte Tiere |     |      | Kontrolle |     |      | W.I. |
|---------|--------------------|-----|------|-----------|-----|------|------|
|         | n                  | +   | %    | n         | +   | %    |      |
| 9       | 36                 | 8   | 22,2 | 36        | 5   | 13,9 | 0    |
| 12      | 55                 | 25  | 45,5 | 59        | 37  | 62,9 | 27,7 |
| 13      | 60                 | 20  | 33,4 | 60        | 27  | 45,1 | 25,9 |
| 14      | 60                 | 30  | 50,0 | 60        | 34  | 56,8 | 0    |
| 15      | 60                 | 29  | 48,4 | 60        | 22  | 36,6 | 0    |
| Summe   | 271                | 112 | 41,4 | 275       | 125 | 45,4 | 8,9  |

Tabelle I: Ergebnisse der oralen Immunisierung  
mit DMSO-Vollantigen  
Infektion: oral

| Versuch | Immunisierte Tiere |    |      | Kontrolle |    |      | W.I. |
|---------|--------------------|----|------|-----------|----|------|------|
|         | n                  | +  | %    | n         | +  | %    |      |
| 15      | 60                 | 24 | 40,1 | 60        | 22 | 36,6 | 0    |
| 18      | 40                 | 15 | 37,5 | 40        | 32 | 80,0 | 53,2 |
| Summe   | 100                | 39 | 39,0 | 100       | 54 | 54,0 | 27,8 |

Tabelle II: Ergebnisse der subkutanen Immunisierung  
mit DMSO-Vollantigen  
Infektion: oral

Orale Immunisierung mit DMSO-Vollantigen aus *S. typhi* murium-Bakterien  
(5 Versuche mit 546 Mäusen)

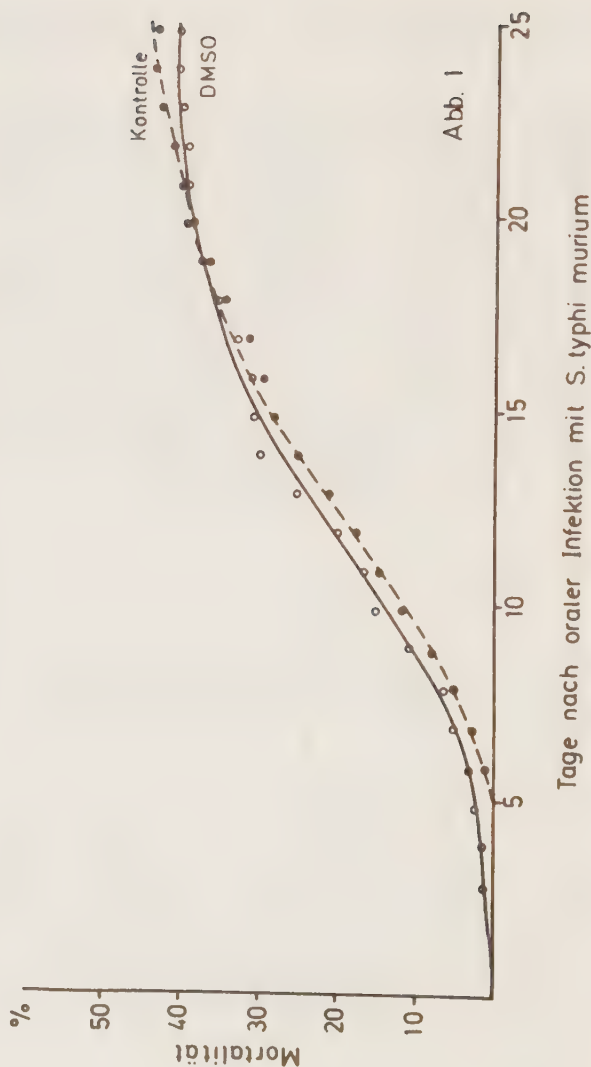


Abb. 1

Subkutane Immunisierung mit DMSO-Vollantigen aus *S. typhi* murium -  
Bakterien  
(2 Versuche mit 200 Mäusen)

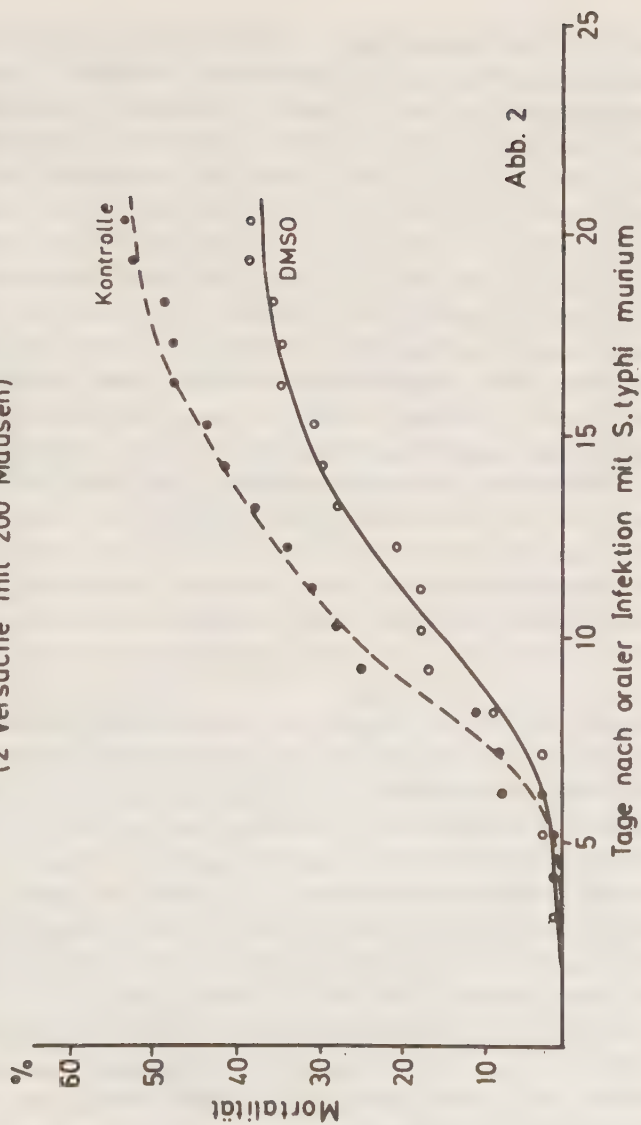


Abb. 2

ist mit 0,68 kleiner als 1, womit sich auch bei dieser Applikationsform kein signifikanter Unterschied zwischen immunisierten Tieren und Kontrollen ergibt. Abbildung 1 und 2 stellen die Summenkurven der Anzahl der gestorbenen Tiere bezogen auf die Gesamtzahl der immunisierten Tiere gegenüber den Kontrollen ( Mortalität ) dar. In Abbildung 1 zeigt die Kurve der immunisierten Tiere einen fast gleichen Verlauf, wie die der Kontrollen. Bemerkenswert ist, daß die immunisierten Tiere von Beginn des Versuches an eine größere Mortalität aufweisen als die Kontrollen, was durch eine Minderung der unspezifischen Resistenz hervorgerufen werden könnte, die ihrerseits durch Ballaststoffe des Impfstoffes bedingt sein kann. Im Gegensatz dazu verläuft die Kurve der subkutan immunisierten Tiere gegenüber den Kontrollen weniger steil und zeigt gegen Ende eine deutliche Differenz, was für eine Verlängerung der Überlebenszeit und damit für eine Steigerung der Überlebenschance sprechen könnte, obwohl sich die Differenz in der Mortalität als nicht signifikant erwiesen hat.

Tabelle III und IV zeigen die Versuche mit LPS-Impfstoff. Die Mortalität konnte bei den oral immunisierten Tieren gegenüber den Kontrollen von 63,0 % auf 47,9 % gesenkt werden. Die beobachtete Differenz beträgt also 15,1 %, der Wirkungsindex 24,0. Bei den subkutan immunisierten Tieren konnte die Mortalität gegenüber den Kontrollen von 60,8 % auf 43,2 %, also um 17,6 %, gesenkt werden. Der Wirkungsindex beträgt 29,0. Die größte zulässige Zufallsdifferenz beträgt bei oraler Immunisierung  $D_z = 11,6 \%$  ( Tabelle XI ), bei subkutaner  $D_z = 16,5 \%$  ( Tabelle XII ), sodaß  $D_b$  um das 1,29-fache bzw. um das 1,09-fache  $D_z$  übersteigt. Bei beiden Applikationsformen wiesen die Ergebnisse einen etwa gleichen Schutzeffekt auf, was auch in Abbildung 3 und 4 deutlich wird.

| Versuch | Immunisierte Tiere |     |      | Kontrolle |     |      | W.I. |
|---------|--------------------|-----|------|-----------|-----|------|------|
|         | n                  | +   | %    | n         | +   | %    |      |
| 1       | 60                 | 38  | 63,1 | 60        | 46  | 76,4 | 17,4 |
| 2       | 75                 | 39  | 53,2 | 75        | 44  | 58,5 | 9,1  |
| 3       | 45                 | 22  | 48,8 | 70        | 54  | 78,2 | 40,8 |
| 4       | 45                 | 18  | 39,9 | 75        | 54  | 77,3 | 48,4 |
| 5       | 45                 | 19  | 42,2 | 75        | 43  | 57,2 | 26,2 |
| 8       | 26                 | 6   | 23,1 | 48        | 12  | 24,9 | 7,6  |
| Summe   | 296                | 142 | 47,9 | 403       | 253 | 63,0 | 24,0 |

Tabelle III: Ergebnisse der oralen Immunisierung mit Lipopolysacchariden aus S.typhimurium  
Infektion: oral

| Versuch | Immunisierte Tiere |    |      | Kontrolle |     |      | W.I. |
|---------|--------------------|----|------|-----------|-----|------|------|
|         | n                  | +  | %    | n         | +   | %    |      |
| 3       | 30                 | 16 | 53,3 | 70        | 54  | 78,2 | 31,5 |
| 4       | 30                 | 15 | 50,0 | 75        | 54  | 77,3 | 35,3 |
| 5       | 30                 | 9  | 30,0 | 75        | 43  | 57,2 | 47,7 |
| 8       | 19                 | 8  | 42,1 | 48        | 12  | 24,9 | 0    |
| Summe   | 109                | 48 | 43,2 | 268       | 163 | 60,8 | 29,0 |

Tabelle IV: Ergebnisse der subkutanen Immunisierung mit Lipopolysacchariden aus S.typhimurium  
Infektion: oral

Orale Immunisierung mit Lipopolysacchariden aus *S. typhi* murium-Bakterien  
( 6 Versuche mit 699 Mäusen )

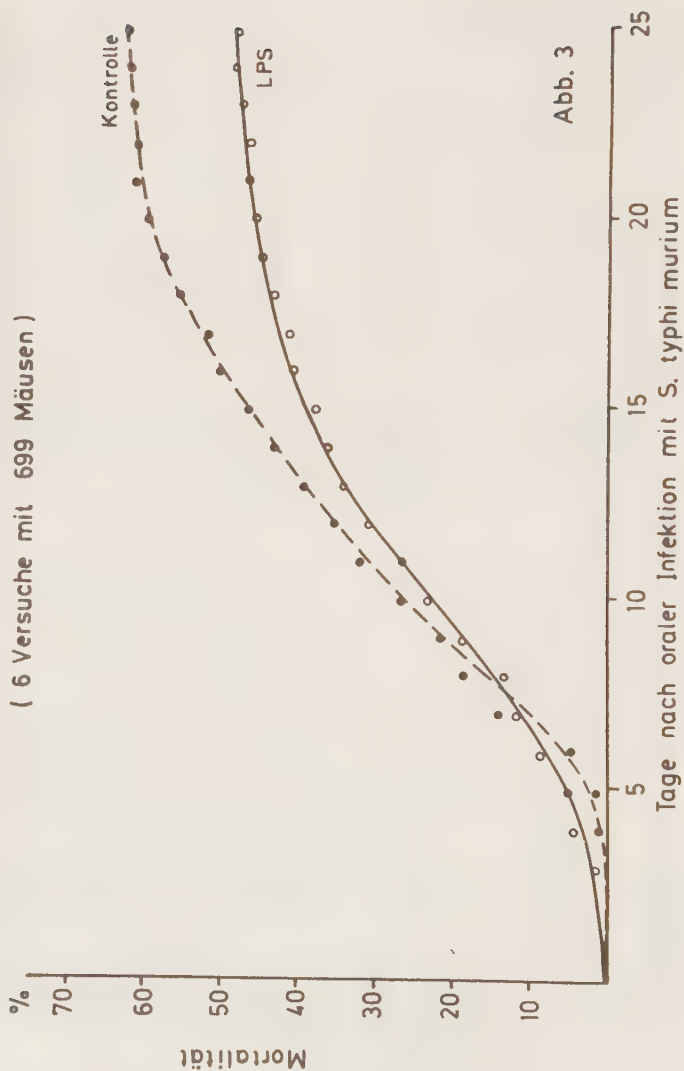


Abb. 3

Subkutane Immunisierung mit Lipopolysacchariden aus *S. typhi* murium -  
Bakterien  
(4 Versuche mit 377 Mäusen)

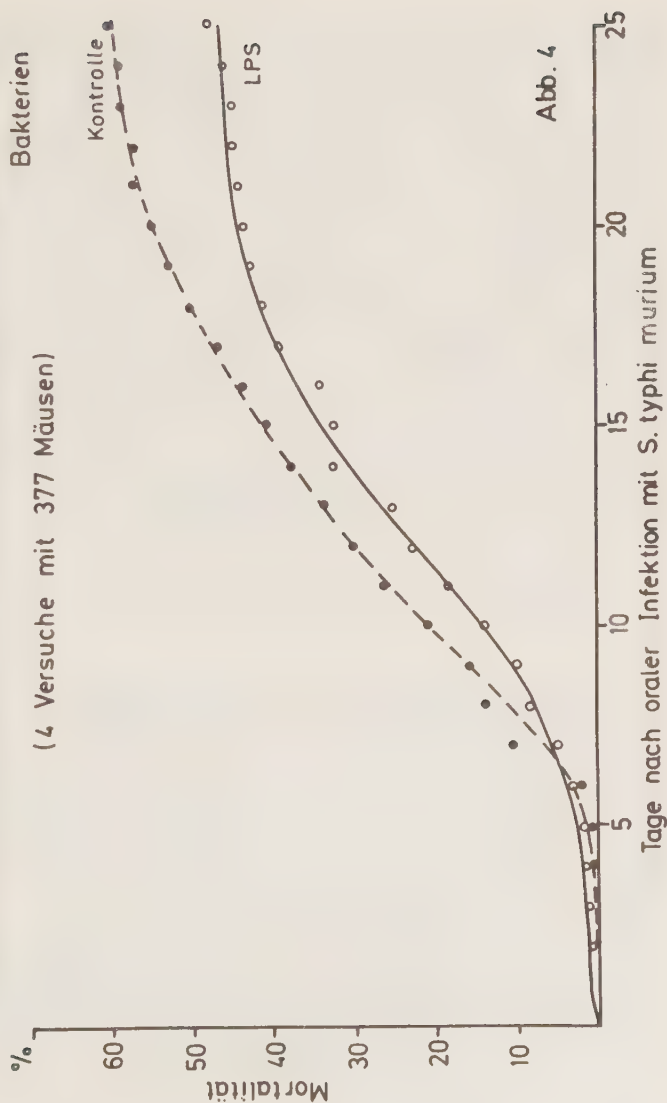


Abb. 4

Höhere Schutzwirkungen als mit dem LPS-Impfstoff konnten mit dem Acetonimpfstoff erreicht werden ( Tabelle V und VI ). Bei oraler Immunisierung beträgt die beobachtete Differenz Db 22,1 %, der Wirkungsindex 34,5, die größte zulässige Zufallsdifferenz  $Dz = 12,6 \%$ . Db übersteigt Dz um das 1,75 fache, ist statistisch also signifikant. Der Wirkungsindex bei der subkutanen Immunisierung liegt bei 39,6, die Db bei 24,6 %, die größte zulässige Zufallsdifferenz bei 20,5 %, der Echtheitswert beträgt also 1,17. Auffällig ist, daß bei den Versuchen , besonders bei der oralen Immunisierung bis zum 8.Tag nach der Infektion, die Mortalität der immunisierten Tiere höher liegt als bei den Kontrollen. Dieses Phänomen trat schon bei dem Versuch mit dem LPS und DMSO-Impfstoff auf. Man könnte es darauf zurückführen, daß Reste der Inaktivierungsmittel die Schleimhäute der Tiere derart irritieren, daß eine nachfolgende Infektion einen stärkeren Reiz ausübt als auf unbeeinflusster Schleimhaut.

Die Ergebnisse der Schutzversuche mit thermisch inaktivierten Impfstoffen sind in den Tabellen VII - X zu finden. Mit dem mit  $60^{\circ}\text{C}/75 \text{ min}$  inaktivierten Impfstoff konnte die Mortalität bei oraler Immunisierung von 57,1 % bei den Kontrollen auf 41,0 % bei den immunisierten Tieren gesenkt werden, die beobachtete Differenz Db beträgt also 16,1 %, der Wirkungsindex 28,1.

Bei subkutaner Immunisierung wurde die Mortalität von 59,0 % auf 37,8 % gesenkt, die beobachtete Differenz Db liegt also bei 21,2 %, der Wirkungsindex bei 35,6. Bei dem bei  $100^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$  hergestellten Impfstoff beträgt die Mortalitätssenkung bei oraler Immunisierung Db = 21,5 %, bei subkutaner Db = 22,0 %. Die größte zulässige Zufallsdifferenz Dz und der dazugehörige Echtheitswert sind auf Tabelle XI und XII zu entnehmen.

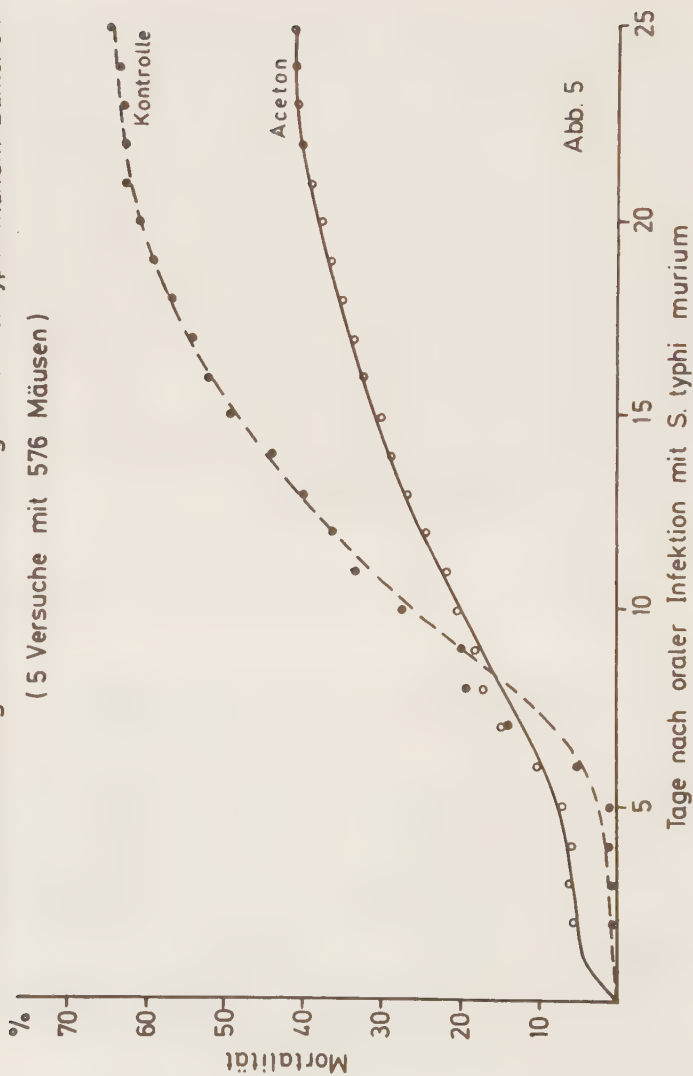
| Versuch | Immunisierte Tiere |     |      | Kontrolle |     |      | W.I. |
|---------|--------------------|-----|------|-----------|-----|------|------|
|         | n                  | +   | %    | n         | +   | %    |      |
| 1       | 60                 | 29  | 48,1 | 60        | 46  | 76,3 | 36,5 |
| 2       | 75                 | 28  | 37,2 | 75        | 44  | 58,5 | 36,4 |
| 3       | 45                 | 17  | 37,3 | 70        | 54  | 78,2 | 52,4 |
| 4       | 45                 | 24  | 52,8 | 75        | 54  | 77,3 | 31,7 |
| 8       | 23                 | 6   | 26,1 | 48        | 12  | 25,0 | 0    |
| Summe   | 248                | 104 | 41,9 | 328       | 210 | 64,0 | 34,5 |

Tabelle V: Ergebnisse der oralen Immunisierung mit Aceton-Vollantigen  
Infektion: oral

| Versuch | Immunisierte Tiere |    |      | Kontrolle |     |      | W.I. |
|---------|--------------------|----|------|-----------|-----|------|------|
|         | n                  | +  | %    | n         | +   | %    |      |
| 3       | 30                 | 16 | 53,3 | 70        | 54  | 78,2 | 31,8 |
| 4       | 30                 | 7  | 23,3 | 75        | 54  | 77,3 | 70,2 |
| 8       | 20                 | 7  | 35,0 | 48        | 12  | 25,0 | 0    |
| Summe   | 80                 | 30 | 37,5 | 193       | 120 | 62,1 | 39,6 |

Tabelle VI: Ergebnisse der subkutanen Immunisierung mit Aceton-Vollantigen  
Infektion: oral

Orale Immunisierung mit Aceton-Vollantigen aus *S. typhi* murium-Bakterien  
( 5 Versuche mit 576 Mäusen )



Subkutane Immunisierung mit Aceton-Vollantigen aus *S. typhi murium*-  
Bakterien

(3 Versuche mit 273 Mäusen)

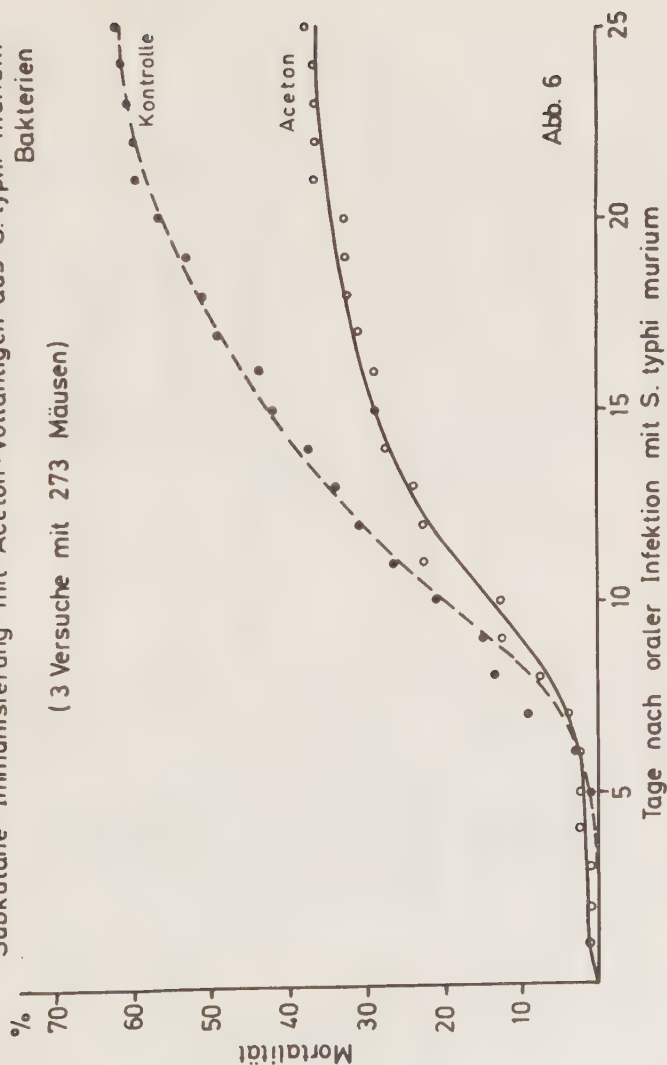


Abb. 6

| Versuch | Immunisierte Tiere |     |      | Kontrolle |     |      |       |
|---------|--------------------|-----|------|-----------|-----|------|-------|
|         | n                  | +   | %    | n         | +   | %    | W. I. |
| 1       | 60                 | 33  | 54,8 | 60        | 46  | 76,4 | 28,3  |
| 2       | 75                 | 40  | 53,2 | 75        | 44  | 58,5 | 9,0   |
| 3       | 45                 | 30  | 67,6 | 70        | 54  | 78,2 | 13,6  |
| 4       | 45                 | 21  | 48,9 | 54        | 54  | 77,3 | 36,8  |
| 5       | 45                 | 13  | 26,6 | 75        | 43  | 57,2 | 53,6  |
| 8       | 23                 | 7   | 30,5 | 48        | 12  | 25,0 | 0     |
| 9       | 44                 | 3   | 6,8  | 36        | 5   | 13,9 | 50,8  |
| 12      | 59                 | 23  | 39,1 | 59        | 37  | 62,9 | 37,8  |
| 13      | 60                 | 22  | 36,7 | 60        | 27  | 45,1 | 18,6  |
| 14      | 60                 | 20  | 33,4 | 60        | 34  | 56,8 | 4,1   |
| 15      | 60                 | 19  | 31,7 | 60        | 22  | 36,6 | 1,3   |
| 18      | 40                 | 22  | 55,0 | 40        | 32  | 80,0 | 43,8  |
| Summe   | 616                | 253 | 41,0 | 718       | 410 | 57,1 | 28,1  |

Tabelle VII: Ergebnisse der oralen Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium* Bakterien ( 60°C/75 min )  
Infektion: oral

| Versuch | Immunisierte Tiere |    |      | Kontrolle |     |      | W. I. |
|---------|--------------------|----|------|-----------|-----|------|-------|
|         | n                  | +  | %    | n         | +   | %    |       |
| 3       | 30                 | 9  | 30,0 | 70        | 54  | 78,2 | 61,7  |
| 4       | 30                 | 10 | 33,3 | 75        | 54  | 77,3 | 57,0  |
| 5       | 30                 | 13 | 43,3 | 75        | 43  | 57,2 | 24,3  |
| 8       | 16                 | 2  | 12,5 | 48        | 12  | 25,0 | 50,0  |
| 15      | 60                 | 18 | 30,1 | 60        | 22  | 36,6 | 1,8   |
| 18      | 40                 | 26 | 65,0 | 40        | 32  | 80,0 | 18,8  |
| Summe   | 206                | 78 | 37,8 | 368       | 217 | 59,0 | 35,6  |

Tabelle VIII: Ergebnisse der subkutanen Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium* Bakterien ( 60°C/75 min ).  
Infektion: oral

Den besseren Immunisierungsschutz des mit 100°C/10 min gegenüber dem 60°C/75 min inaktivierten Impfstoff erkennt man nicht nur an dem besseren Wirkungsindex, der in Tabelle XI und XII aufgetragen ist, sondern auch an der größeren Differenz der Summenkurven der immunisierten Tiere gegenüber den Kontrollen in Abbildung 9 und 10 gegenüber den Abbildungen 7 und 8. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sind in den Tabellen XI und XII vergleichend zusammengefaßt. Hieraus wird ersichtlich, daß zwischen oraler und subkutaner Immunisierung in Bezug auf die Schutzwirkung nur geringe Unterschiede bestehen. Weiterhin ist erkennbar, daß der 100°C/10 min inaktivierte Impfstoff die beste Schutzwirkung aufweist.

| Versuch | Immunisierte Tiere |    |      | Kontrolle |     |      | W. I. |
|---------|--------------------|----|------|-----------|-----|------|-------|
|         | n                  | +  | %    | n         | +   | %    |       |
| 9       | 50                 | 2  | 6,0  | 36        | 5   | 13,9 | 5,6   |
| 12      | 54                 | 12 | 22,2 | 59        | 37  | 62,9 | 58,9  |
| 13      | 60                 | 30 | 50,1 | 60        | 27  | 45,1 | 0     |
| 14      | 60                 | 18 | 30,1 | 60        | 34  | 56,8 | 47,0  |
| 15      | 60                 | 14 | 23,9 | 60        | 22  | 36,6 | 34,7  |
| 18      | 40                 | 17 | 42,5 | 40        | 32  | 80,0 | 46,8  |
| Summe   | 324                | 93 | 28,7 | 315       | 157 | 50,2 | 42,8  |

Tabelle IX: Ergebnisse der oralen Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S.typhi murium* Bakterien ( 100°C/10 min )  
Infektion: oral

| Versuch | Immunisierte Tiere |    |      | Kontrolle |    |      | W. I. |
|---------|--------------------|----|------|-----------|----|------|-------|
|         | n                  | +  | %    | n         | +  | %    |       |
| 15      | 60                 | 16 | 26,7 | 60        | 22 | 36,6 | 2,7   |
| 18      | 40                 | 16 | 40,0 | 40        | 32 | 80,0 | 50,0  |
| Summe   | 100                | 32 | 32,0 | 100       | 54 | 54,0 | 38,8  |

Tabelle X: Ergebnisse der subkutanen Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S.typhi murium* Bakterien ( 100°C/10 min )  
Infektion: oral

| Impfstoffe  | Zahl<br>d.<br>Vers. | Immunisierte<br>Tiere |     | Kontrolle |     |      | W. I. | Db   | Dz   | E    |
|-------------|---------------------|-----------------------|-----|-----------|-----|------|-------|------|------|------|
|             |                     | n                     | +   | n         | +   | %    |       |      |      |      |
| DMSO        | 5                   | 271                   | 112 | 275       | 125 | 45,4 | 8,9   | 4,0  | 12,5 | 0,32 |
| LPS         | 6                   | 296                   | 142 | 403       | 253 | 63,0 | 24,0  | 15,1 | 11,6 | 1,29 |
| Aceton      | 5                   | 248                   | 104 | 328       | 210 | 64,0 | 34,5  | 22,1 | 12,6 | 1,75 |
| 60°C/75min  | 12                  | 616                   | 253 | 718       | 410 | 57,1 | 28,1  | 16,1 | 8,5  | 1,88 |
| 100°C/10min | 6                   | 324                   | 93  | 315       | 157 | 50,2 | 42,8  | 21,5 | 12,0 | 1,75 |

Tabelle XI: Übersicht über die Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Impfstoffen aus *S. typhi murium* bei oraler Immunisierung und nachfolgender oraler Infektion

| Impfstoffe  | Zahl<br>d.<br>Vers. | Immunisierte<br>Tiere |    | Kontrolle |     |      | W.I. | Db   | Dz   | E    |
|-------------|---------------------|-----------------------|----|-----------|-----|------|------|------|------|------|
|             |                     | n                     | +  | n         | +   | %    |      |      |      |      |
| DMSO        | 2                   | 100                   | 39 | 100       | 54  | 54,0 | 27,8 | 15,0 | 22,0 | 0,68 |
| LPS         | 4                   | 109                   | 48 | 268       | 163 | 60,8 | 29,0 | 17,6 | 16,5 | 1,09 |
| Aceton      | 3                   | 80                    | 30 | 193       | 120 | 62,1 | 39,6 | 24,6 | 20,5 | 1,17 |
| 60°C/75min  | 6                   | 206                   | 78 | 368       | 217 | 59,0 | 35,6 | 21,2 | 13,2 | 1,59 |
| 100°C/10min | 2                   | 100                   | 32 | 100       | 54  | 54,0 | 38,8 | 22,0 | 21,8 | 1,01 |

Tabelle XII: Übersicht über die Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Impfstoffen aus *S. typhi murium* bei subkutaner Immunisierung und nachfolgender oraler Infektion

Orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi* murium-Bakterien  
(60° / 75 min)  
(12 Versuche mit 1334 Mäusen)

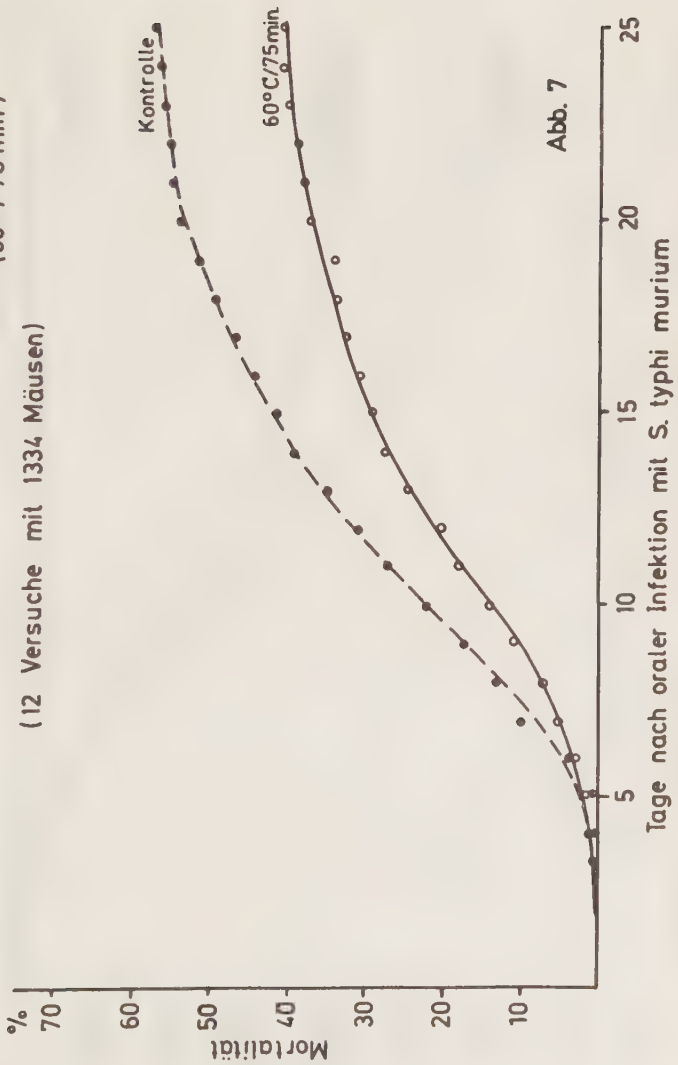


Abb. 7

Subkutane Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi* murium-Bakterien  
(60° C / 75 min)

(6 Versuche mit 574 Mäusen)

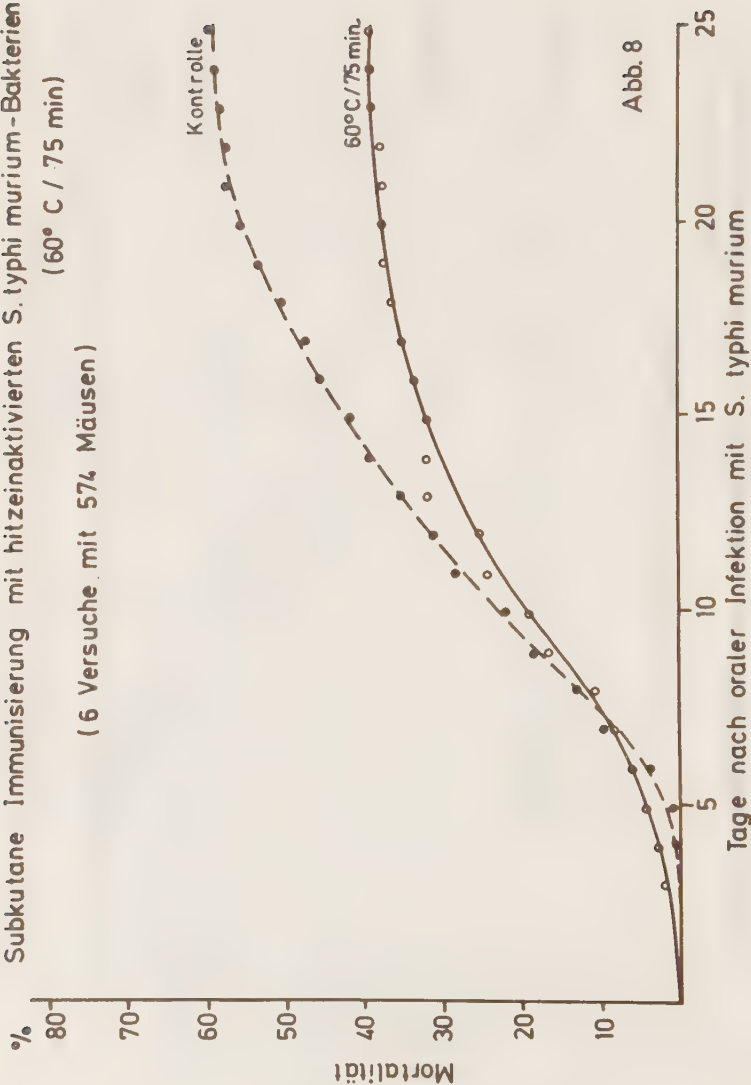


Abb. 8

Orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi* murium - Bakterien  
(100° C / 10 min)  
(6 Versuche mit 639 Mäusen)

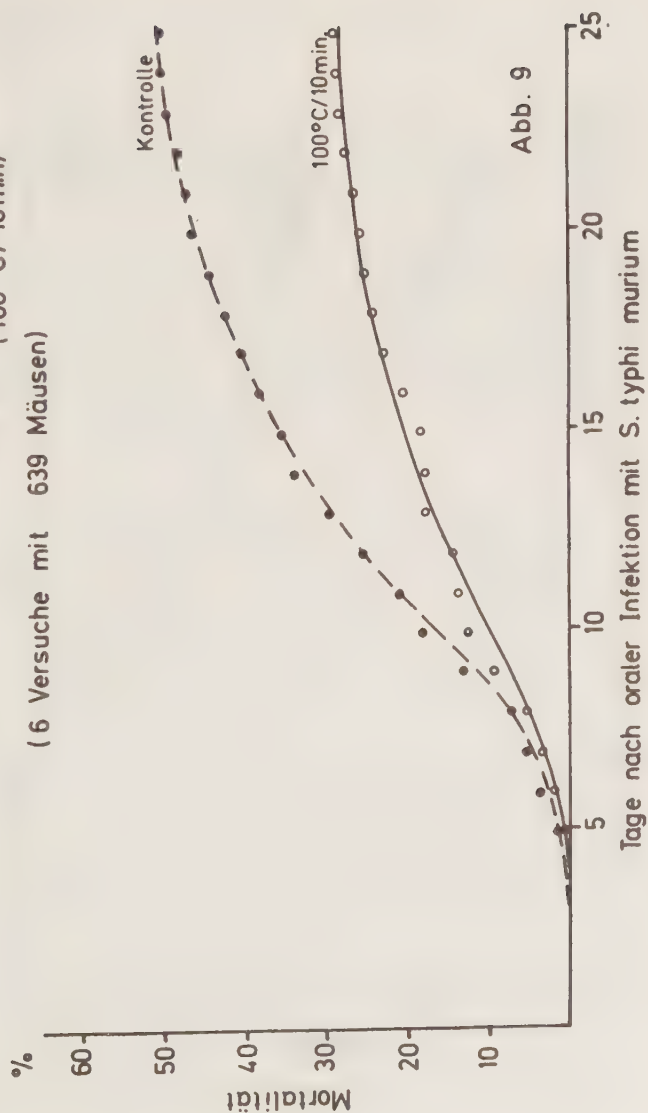


Abb. 9

Subkutane Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium*-  
Bakterien (100°C / 10 min)  
(2 Versuche mit 200 Mäusen)

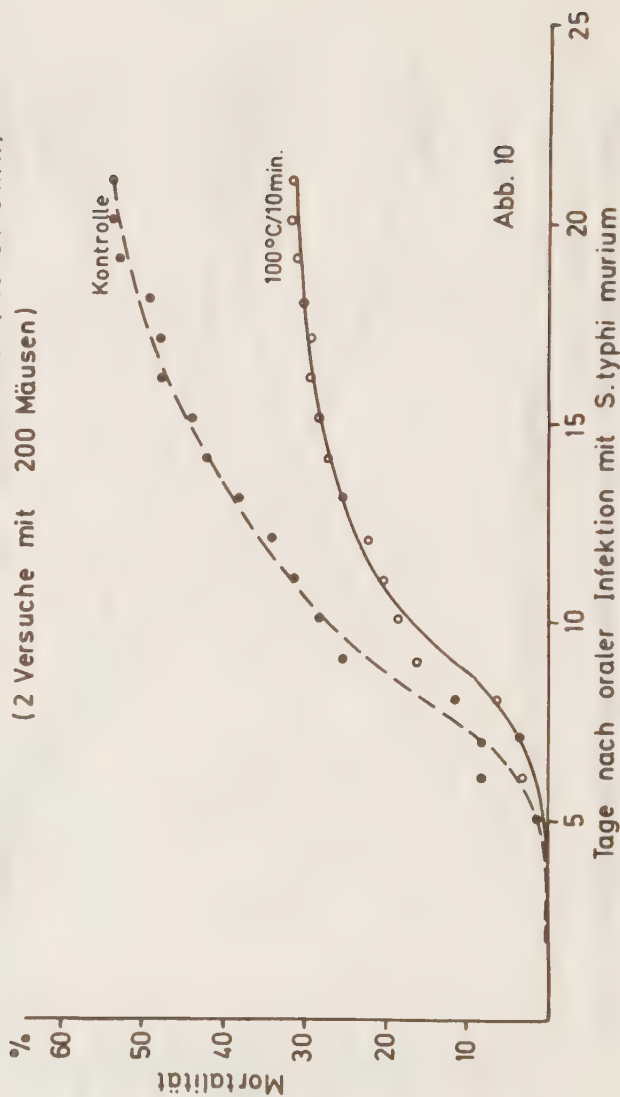


Abb. 10

#### D. DISKUSSION

=====

In den angeführten Versuchen wurden verschieden hergestellte Impfstoffe subkutan und oral an Mäusen verimpft, und die verschiedenen Schutzwirkungen miteinander verglichen. Hierbei wurde einerseits versucht, den Einfluß der Inaktivierungsmittel auf die Immunogenität und damit auf die Schutzwirkung, andererseits den Einfluß der Anwendungsform auf die Schutzwirkung zu bestimmen. Weiterhin ist es möglich, daß Reste der Inaktivierungsmittel, die im Impfstoff verbleiben, eine zusätzliche Wirkung auf den Organismus ausüben.

Die Permeabilitätssteigerung durch DMSO an der Haut ist für zahlreiche Stoffe bekannt ( 1 ). SCHMUDDE ( 24 ) prüfte in Tierversuchen, ob nach DMSO Verfütterung auch die Schleimhaut des Magen-Darmtraktes für Bakterien - antigene permeabler wird. Sie konnte nachweisen, daß hitzeinaktivierte Impfstoffe, denen DMSO zugesetzt wurde, einen schlechteren Schutzeffekt gegen eine nachfolgende orale Infektion hatten als gleiche Impfstoffe ohne DMSO-Zusatz. Eine Beeinträchtigung der Darmschleimhaut in dem Sinne, daß das Antigen in anderer, für die Ausbildung der Immunität schlechteren Weise verarbeitet wird, ist unwahrscheinlich, wie durch Tierversuche von RAETTIG ( 21 ) nachgewiesen wurde. Er zeigte, daß eine orale Infektion mit *S.typhi murium* bei Mäusen, nach vorhergehender Fütterung mit DMSO in ansteigenden Konzentrationen, keine Änderung der Empfindlichkeit bewirkt. Bei einer DMSO-Konzentration von 45 % zeigten die Tiere, die mit dieser Lösung geimpft wurden, sogar einen unspezifischen Schutz gegenüber der Infektion.

In den hier beschriebenen Versuchen wurde der Schutzeffekt eines Impfstoffes untersucht, der durch Behandlung von lebenden Bakterien mit DMSO gewonnen wurde. Die Wirkung von DMSO auf ein Vollantigen kann durch eine Denaturierung aller Eiweißkomponenten und eine Abspaltung der Polysaccharide charakterisiert werden.

F.GEHRING ( 3 ) konnte aus *Streptococcus viridans* durch Zusatz von DMSO sowohl typen- wie gruppenspezifische Polysaccharide lösen und im Immunodiffusionstest nachweisen. ORMSBEE et al. ( 14 ) konnten aus *Coxiella burnetii* unter Zusatz von DMSO einen Extrakt gewinnen, der kein Protein und wenig Stickstoff enthält. Mit dieser Substanz konnten die Komplementbindungsreaktion und Präzipitation durchgeführt werden. Bei subkutaner Immunisierung von Meerschweinchen mit dieser Substanz ergab sich ein Schutz von 50 % gegen eine nachfolgende peritoneal gesetzte Infektion. Die Verfasser sind der Ansicht, daß dieser Schutz durch Polysaccharide, die durch DMSO abgespalten wurden, hervorgerufen wird.

*S.typhi murium*-Bakterien wurden ähnlich wie bei ORMSBEE mit DMSO behandelt, es konnte aber weder bei oraler noch bei subkutaner Immunisierung und nachfolgender oraler Belastung ein Schutz hervorgerufen werden. Bei den oral geimpften Tieren zeigte sich sogar eine höhere Mortalität als bei den Kontrollen. Diese Erscheinung könnte auf ein Kopplungsprodukt von DMSO und Antigen zurückgeführt werden, das toxisch wirkt, da das DMSO allein keine ähnliche Wirkung hervorruft. Die fehlende Schutzwirkung bei der oralen Immunisierung könnte man darauf zurückführen, daß entweder die Polysaccharide bei Mäusen nicht in der Lage sind nach der Resorption einen Immunreiz auszuüben, oder aber durch das DMSO

in ihrer Spezifität beeinträchtigt werden. Das Ergebnis konnte aber aufgrund eines zu geringen Tiermaterials statistisch nicht gesichert werden.

Um zu untersuchen, wie groß der Schutzeffekt von Polysacchariden bei Mäusen ist, wurden diese entsprechend einem von WESTPHAL und LÜDERITZ ( 28 ) angegebenen Verfahren hergestellt. WESTPHAL und LÜDERITZ ( 29, 30, 13 ) konnten mit wassergesättigtem Phenol ein Lipopolysaccharid reinigen, das dem Endotoxin entspricht und die serologische O-Spezifität besitzt. Sie konnten außerdem nachweisen, daß allein die Zuckerbausteine für die Spezifität verantwortlich sind ( 9 ).

In den durchgeführten Versuchen konnte festgestellt werden, daß dieses Antigen im Vergleich zu einem Impfstoff aus Ganzzellen einen schlechteren Schutzeffekt sowohl bei der subkutanen als auch bei der oralen Immunisierung hatte. RIBI et al. ( 22 ) fanden, daß das Absinken der biologischen Wirksamkeit des Endotoxins mit der Dissoziation in Spaltprodukte der als Hapten fungierenden Polysaccharide einhergeht und behaupten, daß eine der wichtigsten Voraussetzungen für die biologische Wirksamkeit makromolekulare Komplexe von einer kritischen Größe sind. Der geringere Schutzeffekt bei oraler und subkutaner Immunisierung mit Lipopolysacchariden können dadurch bedingt sein, daß dem LPS-Komplex der Proteinanteil fehlt, wie dies auch bei dem vorhergehenden Versuch mit DMSO behandelten Bakterien vermutet wurde oder aber, daß das Lipopolysaccharid im Magen-Darmtrakt aufgespalten wird und dadurch an Wirkung verliert. Diese Vermutung wurde auch durch Tier- und Feldversuche, die in Polen und der UDSSR mit verschiedenen Impfstoffen durchgeführt worden sind, bekräftigt, in denen der LPS-Impfstoff bei subkutaner Immunisierung ebenfalls einen geringeren Schutzeffekt aufwies ( 4, 8, 15, 16 ).

LANDY ( 10 ) behandelte Vi-haltige Typhusstämmen mit Aceton und fand dabei, daß die so hergestellten Impfstoffe einen hohen Grad an Vi-Antigen besitzen. Die gute Wirkung dieses Impfstoffes konnte in Tier- und Feldversuchen nachgewiesen werden, und daher machte die WHO für die Wirkung des Typhusimpfstoffes das Vi-Antigen verantwortlich. Da die hier verwendeten Bakterienstämmen kein Vi-Antigen enthalten, kann das O-Antigen demnach nicht allein für die Schutzwirkung eines Impfstoffes aus Ganzzellen, wie er zum Beispiel nach thermischer Inaktivierung erhalten wird, verantwortlich sein.

HEYMANN und JANDL ( 5, 6 ) wiesen schon darauf hin, daß ein nur Vi-Antigen haltiger Impfstoff nicht gegen eine Infektion mit einem nur O-Antigen haltigen Infektionserreger schützen kann. Sie konnten dies in aktiven und passiven Schutzversuchen an Mäusen nachweisen.

Der bei den hier durchgeführten Versuchen verwendete Impfstoff wurde aus Bakterienstämmen hergestellt, die in ihrer Antigenstruktur kein Vi-Antigen enthalten. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß auch ein nicht Vi-Antigen haltiger Impfstoff, der mit Aceton hergestellt wurde, einen guten Schutz gegenüber einer Infektion erreicht. Es konnte ein Wirkungsindex von 35 % ( oral ) bzw. 39 % ( subkutan ) erreicht werden. Daraus kann gefolgert werden, daß der Schutzeffekt weder vom O-Antigen allein noch vom Vi-Antigen allein hervorgerufen wird, sondern daß noch weitere antigen-wirksame Substanzen in Bakterien vorhanden sein müssen, die auch spezifisch wirken können. Diese Substanzen werden durch verschiedene chemische Inaktivierungsmittel verschieden stark angegriffen. Die DMSO-Inaktivierung läßt weitgehend die LPS unbeeinflusst, während das Eiweiß weitgehend denaturiert wird und daher dieser so hergestellte Impfstoff in seinem Schutzeffekt mit reinem LPS vergleichbar ist. Der durch Acetonbehandlung

von Bakterien hergestellte Impfstoff hat dagegen eine größere Schutzwirkung, was weitere antigenwirksame Stoffe vermuten läßt, die durch diese Behandlung in ihrer Struktur und Wirksamkeit erhalten bleiben.

Die beste Schutzwirkung konnte mit dem durch Hitze - inaktivierung von Bakterien hergestellten Impfstoff erreicht werden, aber nicht wie vermutet mit den bei  $60^{\circ}\text{C}/75$  min lang inaktivierten Bakterien, sondern mit den  $100^{\circ}\text{C}/10$  min. Dieses Verhalten, das der  $100^{\circ}\text{C}/10$  min Impfstoff gegenüber dem  $60^{\circ}\text{C}/75$  min Impfstoff zeigt, könnte dadurch bedingt sein, daß bei der kurzen aber heftigen Erhitzung die thermische Wirkung ausreicht, um die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien zu zerstören, die Antigenität aber bei dieser Dosis geringer beeinträchtigt wird, als bei der langdauernden Wirkung bei niedrigerer Temperatur.

LANGE und KAUFFMANN (6,11 ) fanden, daß eine Erhitzung von Mäusetyphusbakterien auf  $100^{\circ}\text{C}/10$  min die Antigenität nicht zerstörte, sondern in Schutzversuchen gute Ergebnisse zeigte. Sie konnten eine Vergleichbarkeit zwischen dem O-Agglutinationstiter und dem erreichten Infektionsschutz feststellen. SCHWAB ( 26 ), der Serum auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzte, konnte ebenfalls nachweisen, daß keine Zerstörung der Antigenität stattfand. Er erklärte dies damit, daß bei der kurzzeitigen Erhitzung auf  $100^{\circ}\text{C}$  nicht alle Proteine zerstört werden. ZINSSER ( 33 ) kam zu ähnlichen Ergebnissen und vermutete ebenfalls, daß nicht alle Proteine denaturiert werden, da eine nachfolgende Behandlung des gekochten Serums mit Alkohol die vorher vorhandene Fähigkeit mit Antikörpern zu reagieren, völlig zerstörte. SCHÜTZE ( 25 ) erhitzte *Salmonella aertrycke* auf  $100^{\circ}\text{C}/15$  min lang und konnte in Schutzversuchen einen guten Effekt erzielen, während dies mit  $100^{\circ}\text{C}/2$  Stunden erhitzten Bakterien nicht mehr gelang.

Alle diese Befunde sprechen dafür, daß die gute Wirkung des 100°C Impfstoffes auf nicht denaturiertem Eiweiß beruhen könnte. Geht man von der Voraussetzung aus, daß das Endotoxin hitzestabil ist, würde dieses nicht denaturierte Eiweiß den besseren Schutzeffekt gegenüber dem gereinigten LPS Impfstoff erklären, der ja völlig frei von Proteinen war. Man kann also daraus schließen, daß das LPS die O-Spezifität besitzt, aber zu einer wirksamen Immunisierung der Eiweißanteil fehlt.

Die Versuche zeigen, daß alle Impfstoffe in ihrer Schutzwirkung unterschiedlich waren, je nachdem die Antigenstruktur durch die Inaktivierungsmittel mehr oder weniger beeinflußt wurde. Dagegen zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede der einzelnen Impfstoffe bei verschiedener Anwendung. In diesen Tierversuchen konnte somit gezeigt werden, daß die subkutane Immunisierung keine bessere Schutzwirkung bietet als die orale. Die Vorzüge der oralen Immunisierung sind jedoch so wesentlich, daß diese Applikationsform der subkutanen Impfung vorzuziehen ist. Die orale Immunisierung ist schnell und leicht auszuführen, was in einem Epidemiefall von entscheidener Bedeutung ist. Darüber hinaus fehlt die Provokation während der Inkubationszeit, die Nebenwirkungen sind gering, und der Impfstoff hat eine gute Lagerfähigkeit.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

=====

In Tierversuchen an Mäusen wurden drei auf chemischem Wege inaktivierte und zwei aus mit hitzeinaktivierten Bakterien hergestellten Impfstoffe bei subkutaner und oraler Immunisierung verglichen. Die Infektion erfolgte oral.

1. Den besten Schutz bot der bei 100°C/10 min hergestellte Impfstoff, es folgte dann der Acetonimpfstoff, dann der bei 60°C/75 min inaktivierte Impfstoff und zuletzt der LPS- und DMSO-Impfstoff. Die Gründe dafür werden diskutiert.
2. Unterschiedliche Schutzwirkungen zwischen oraler und subkutaner Immunisierung mit jeweils einem Impfstoff konnten nicht festgestellt werden. Die Vorteile der oralen Immunisierung werden dargelegt.

F. LITERATUR

=====

1. DMSO Symposium Wien  
Saladruck, Berlin 1966
2. FRÄNKEL, E. und E. SCHULTZ  
Versuche zur peroralen Immunisierung  
Z. Immun.-Forsch. 53, 478-486 ( 1927 )
3. GEHRING, F.  
Dimethylsulfoxyd als Extraktionsmittel für  
Streptococcen Antigene  
Naturwissenschaften 54, 372 ( 1967 )
4. HEJFEC, L. B.  
Results of the study of typhoid vaccines in four  
controlled field trials in the USSR  
Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 1-14 ( 1965 )
5. HEYMANN, G. und G. JANDL  
Experimentelle Untersuchungen zur Wertbemessung  
von Typhusimpfstoffen  
Z. Immun.-Forsch. 119, 279-294 ( 1960 )
6. Experimentelle Untersuchungen zur Wertbemessung  
von Typhusimpfstoffen  
Z. Immun.-Forsch. 120, 376 - 401 ( 1960 )
7. JANDL, G.  
Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus  
der oralen Typhusimmunisierung  
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 151, 34-44 ( 1965 )

8. KOSTRZEWSKI, J., J. PLACHINSKA, J. TADOSZ und L. RZUCIDTO  
Wstepne badania nad standaryzacja testu czynnego na myszach nodpornianych endotoksyna durowa i zakazonych S.typhi  
Przegl. Epidemiol. 15, 295-309 ( 1962 )  
(Zbl.Bakt. I Abt. Ref. 184, 468 ( 1962 )
9. KRÖGER, E., O. LÜDERITZ und O. WESTPHAL  
Zuckerbausteinanalyse der endotoxischen Lipopolysaccharide aus gram-neg. Bakterien und ihren isolierten Zellwänden  
Naturwissenschaften 46, 428 ( 1959 )
10. LANDY, M.  
Relative Vi antigen content of cultures  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 80, 55-58 ( 1952 )
11. LANGE, B. und F. KAUFFMANN  
Experimentelle Untersuchungen über die Immunität beim Mäusetyphus  
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 115, 110-153 ( 1933 )
12. LODENKÄMPFER, H.  
Über das Problem der oralen Immunisierung  
Wien. med. Wschr. 114, 860 ( 1964 )
13. LÜDERITZ, O., F. KAUFFMANN, H. STIERLIN und O. WESTPHAL  
Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae  
Zbl. Bakt. I Orig. 179, 180-186 ( 1960 )
14. ORMSBEE, R. A., E. J. BELL und D. B. LACKMANN  
Antigens of Coxiella burneti  
I. Extraction of antigens with nonaqueous organic solvents  
J. Immunol. 88, 741-749 ( 1962 )

15. POLISH TYPHOID COMMITTEE

Bull.Wld.Hlth.Org. 32, 15-27 ( 1965 )

16. PLACHINSKA, J., M.KRUCZALOWA und H.HULNICKA

Zastosowanie testu czynnego na myścach do  
określenia mocy immunogennej różnych szczepów  
S.typhi oraz endotoksyna durowej

Przegl.Epidemiol. 16, 13-18 ( 1962 )

(Zbl.Bakt.I Abt.Ref.186, 557-558 ( 1962 ))

17. RAETTIG, H.

Tierexperimente zur oralen Immunisierung mit  
inaktiviertem Antigen

Zbl.Bakt.I Orig. 182, 525-528 ( 1961 )

18. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-  
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen  
1.Mitt.: Der Grundversuch zur Schutzimpfung  
der Maus gegen eine Enteritis-Infektion

Zbl.Bakt. I Orig. 193, 398-410 ( 1964 )

19. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-  
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen  
2.Mitt.: Experimente zur unspezifischen  
Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion  
der Maus

Zbl.Bakt. I Orig. 197, 368-388 ( 1965 )

20. Die lokale Immunisierung mit inaktivierten Antigenen  
gegen bakterielle Darminfektionen ( Typhus, Para-  
typhus, Cholera und Ruhr)

Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 183, 1-54 ( 1962 )

21. Möglichkeiten der DMSO in der experimentellen  
Immunologie

DMSO-Symposium Wien 1966, Sala-Druck Berlin

22. RIBI, E., W.T.HASKINS, K.C.MILNER, R.L.ANACKER,  
D.B.RITTER, G.GOOD, R.-J.TRAPANI und M.LANDY

Physico-chemical changes in endotoxin  
associated with loss of biological potency

J.Bact. 84, 803-814 ( 1962 )

23. RUSSU, V.V., I.R. VLADOIANU, L. NAS, S. MUSCAN,  
H. BASIU, E. DANCILA et E. TOTESCO  
Contribution à l'étude de l'efficacité  
des méthodes entéroles de vaccination T.A.B.  
Arch. ROUM. Path. exp. Microbiol. 17, 45 ( 1958 )  
(Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 172, 129 ( 1959 ))
24. SCHMUDDE, R.  
Vergleichende orale, nasale und rektale  
Impfung von Mäusen mit inaktivierten S.  
typhi murium Bakterien mit und ohne DMSO  
Zugabe  
Diss. 1968 Berlin
25. SCHÜTZE, H.  
The importance of somatic antigen in the  
production of Aertrycke and Gärtner immunity  
in mice  
Brit. J. exp. Path. 11, 34-42 ( 1930 )
26. SCHWAB, E.  
Versuche über das serologische Verhalten  
nativen und erhitzten Blutserums bei der  
Komplementbindung  
Z. Immun.-Forsch. 92, 289-303 ( 1938 )
27. VLADOIANU, I.R., G. DIMACHE, S. ANTOHI, C. VLADOIANU  
and O. ZARMA  
Laboratory tests on the effectiveness of oral  
vaccination of young children against typhoid  
and paratyphoid A and B  
Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 37-45 ( 1965 )  
( Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 201, 151 ( 1966 ))
28. WESTPHAL, O. und O. LÜDERITZ  
Chemische Erforschung von LPS gramnegativer  
Substanzen  
Angew. Chem. 66, 407-417 ( 1954 )
29. Über die chemische und biologische Analyse  
hochgereinigter Bakterienpolysaccharide  
Dtsch. Med. Wschr. 78, 775-781 ( 1953 )

30. WESTPHAL, O., F. KAUFFMANN, O. LÜDERITZ und H. STIERLIN  
Zur Immunochemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae  
Zbl. Bakt. I. Org. 179, 336-342 ( 1960 )
31. YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION  
Field and laboratory studies with typhoid vaccines  
Bull. Wld. Hlth. Org. 16, 897-910 ( 1957 )
32. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-dried and inactivated and heat-phenol inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia  
Bull. Wld. Hlth. Org. 30, 623-630 ( 1964 )
33. ZINSSER, H.  
On antigenic properties of horse-serum and egg-albumen after heat-coagulation  
J. Immunol. 9, 227-230 ( 1924 )

Ich danke Herrn Prof.Dr.H. R a e t t i g  
für die Überlassung des Themas, weiterhin  
danke ich Herrn Dr.Herrmann, Leiter der  
chemischen Abteilung des Robert Koch-Insti-  
tutes, für die Hilfe bei der Herstellung  
der Lipopolysaccharide. Der Schering AG  
danke ich für die Überlassung eines Teiles  
des DMSO-Impfstoffes. Herrn Dr.Pichl danke  
ich besonders für die Hilfe bei der Durch-  
führung der Arbeit.

Für die Unterstützung bei den Tierversuchen  
danke ich Frau Ganze'.

## Lebenslauf

=====

Ich wurde am 25. Mai 1940 als Tochter des Dr. med. Otto Janisch und seiner Ehefrau Berta Janisch in Berlin geboren. Sechs Jahre besuchte ich die Grundschule, anschließend neun Jahre die Oberschule und legte 1961 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1961 wurde ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert, an der ich als Hauptfach Humanmedizin studierte. Hier legte ich 1962 das Vorphysikum, 1964 das Physikum und 1967 das Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistentin war ich sieben Monate an der Inneren Abteilung des Krankenhauses Tegel-Süd, drei Monate an der Anästhesieabteilung des Krankenhauses Westend, vier Monate an der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Spandau und drei Monate im Kinderkrankenhaus Wedding tätig.

Seit Juli 1968 bin ich mit Bernd Kordes verheiratet.



